

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ОСИПОВ
Владимир Алексеевич

**Зависимость флуоресцентных параметров микроводорослей от факторов
среды, включая антропогенные загрязнения**

03.00.16. – экология, 03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедрах гидробиологии и биофизики биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

- доктор биологических наук, профессор В.Д. Федоров
- доктор биологических наук, вед. н. сотр. Д.Н. Маторин

Официальные оппоненты:

- доктор биологических наук, профессор В.Д. Абакумов
- доктор биологических наук, Н.Г. Бухов

Ведущая организация: Московский государственный университет технологии и управления

Защита диссертации состоится 8 февраля 2007 г. в 15 часов 30 мин
на заседании диссертационного совета Д.501.001.55 при Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова, по адресу: 119992, г. Москва, Воробьевы горы, МГУ им.
М.В. Ломоносова, Биологический факультет, аудитория 389

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « » 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.В. Карташева

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Фитопланктон является базовым звеном водных экосистем, определяя их состояние и продуктивность. При действии различных экологических факторов и антропогенных загрязнений в первую очередь изменяются фотосинтетическая активность и численность клеток водорослей (Федоров, 1991; Маторин, Венедиктов, 1990; Маторин и др., 1996; Falkowski, Raven, 1997). Изменения фотосинтеза фитопланктона приводят к изменениям в остальных звеньях водной экосистемы.

Для быстрой диагностики фитопланктона в природных условиях развиваются современные методы регистрации флуоресценции хлорофилла, которые позволяют получать информацию о количестве и активности фототрофных организмов, а также по характеристикам состояния фотосинтетического аппарата оценивать физиологическое состояние клеток и судить о качестве водной среды (Antal *et al.*, 2001; Beutler *et al.*, 2002). Важным преимуществом этих методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние фитопланктона непосредственно в среде его обитания *in situ* в режиме реального времени (Маторин и др., 1996). Оперативность измерений показателей флуоресценции на экспедиционных судах имеет особое значение при изучении мезомасштабных процессов в морских экосистемах, которые отличаются большой временной изменчивостью (Fadeev *et al.*, 1999; Ostrowska, 2001; Ильяш и др., 2004).

Основой флуоресцентных методов является то, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей. Достижения в изучении механизмов первичных процессов фотосинтеза выявили связь показателей флуоресценции хлорофилла с характеристиками состояния фотосинтетического аппарата фотосинтезирующих организмов (Krause, Weis, 1991; Matorin *et al.*, 2002). Энергия кванта света, поглощенного светособирающим комплексом, может быть превращена в энергию разделенных зарядов, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или за счет рассеяния в тепло. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтезе возбуждающем свете (F_m) и условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_o), позволяет определить эффективность первичных процессов фотосинтеза, которая равна $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$. Эффективность первичных процессов фотосинтеза (F_v/F_m) представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма (Krause, Weis, 1991). Интенсивность флуоресценции F_o с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию светособирающих пигментов фотосинтетического аппарата фитопланктона, и, соответственно, коррелируют с обилием фитопланктона (Ostrowska *et al.*, 2000; Matorin *et al.*, 2004).

Сейчас во многих лабораториях, занимающихся разработкой новых методов экологического мониторинга, направление диагностики фотосинтеза интенсивно развивается. Несомненно, ему принадлежит большое будущее, поскольку оно обеспечивает раннюю экспресс-диагностику состояния клеток в природных условиях.

Однако связь между изменениями различных параметров флуоресценции микроводорослей и фотосинтетического аппарата до конца не выяснены в связи со сложностью процессов. Первичные стадии фотосинтеза водорослей при действии факторов внешней среды не остаются неизменными, а активно регулируются клеткой в соответствии с ее физиологическим состоянием, что соответственно приводит к изменениям параметров флуоресценции. Выяснение этих вопросов может дать понимание как процессов фотосинтеза водорослей в природных условиях, так и позволит с большей информативностью проводить мониторинговые исследования водной среды с использованием флуоресцентных методов.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось выяснение механизмов изменений параметров флуоресценции водорослей при воздействии неблагоприятных факторов среды и оценка возможности использования различных параметров флуоресценции для определения состояния природного фитопланктона. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать закономерности изменений параметров быстрой флуоресценции хлорофилла «a» под действием света повышенной интенсивности у культур диатомовых водорослей и на природном фитопланктоне;
2. Оценить изменение характеристик флуоресценции у водорослей в условиях разного фона минерального питания;
3. Исследовать влияние на параметры флуоресценции водорослей загрязнений солями ртути и меди;
4. Изучить изменение параметров флуоресценции у природного фитопланктона в разных условиях на примере Черного и Балтийского морей с использованием погружного и проточного флуориметров;
5. На основе полученных данных отработать методологию использования проточного флуориметра для оценки состояния природного фитопланктона.

Научная новизна. На основании анализа результатов, полученных в ходе исследований на культурах микроводорослей и на природном фитопланктоне получены новые данные о закономерностях и последовательности событий в процессе светового повреждения ФСА микроводорослей в лабораторных и природных условиях. Обнаружено, что под действием света, вызывающего насыщение цепи фотосинтетического электронного транспорта, в условиях, когда системы регуляции не справляются с чрезмерно большим потоком электронов и тушением избыточных возбужденных состояний, может происходить фотоокислительное повреждение реакционных центров (РЦ) фотосистемы 2 (ФС 2) водорослей, которое имеет обратимый и необратимый характер. Показано, что обратимая инактивация реакционных центров фотосистемы 2, предшествующая разборке фотосинтетического аппарата водорослей при интенсивностях света превышающей скорость потока электронов по ЭТЦ, носит адаптационный характер. Она является проявлением действия механизма регуляции, направленной на согласование скорости образования продуктов световых реакций фотосинтеза с энергетическими потребностями клеточного метаболизма.

На морских водорослях обнаружено, что в условиях дефицита минерального питания снижается эффективность работы РЦ ФС 2 клеток морских водорослей и изменяются параметры флуоресценции, главным образом за счет увеличения F_0 . При добавлении разных форм неорганического и органического азота происходит восстановление параметра флуоресценции F_v/F_m за счет уменьшения F_0 . Использование параметров флуоресценции позволяет с высокой эффективностью оценивать степень голодания клеток микроводорослей и регистрировать изменения их состояния при появлении в среде азотсодержащих веществ, и тем самым делать прогнозы относительно увеличения ростовых процессов у природного фитопланктона.

Обнаружено резкое усиление чувствительности ФС 2 культур микроводорослей и природного фитопланктона к солям тяжелых металлов (сульфат меди, хлорид ртути, метилртуть) в условиях светового стресса, что связано с необратимым ингибированием ресинтеза D1-белка.

Разработан новый проточный флуориметр для оценки распределения и функционального состояния фотосинтеза фитопланктона в больших акваториях в непрерывном режиме по ходу судна. Впервые изучены изменения характеристик быстрой флуоресценции хлорофилла на природном фитопланктоне с использованием проточного флуориметра. Предложена схема учета изменения параметров флуоресценции в поверхностных водах в условиях полуденной депрессии при избыточной солнечной инсоляции. Предложена оценка адаптационных возможностей природного фитопланктона к солнечному освещению.

Практическое значение. Полученные в работе экспериментальные результаты вносят вклад в понимание процессов, приводящих к изменению фотосинтетической продуктивности природного фитопланктона и являются основой для использования метода быстрой флуоресценции в гидробиологических и океанологических исследованиях.

Проведены работы по мониторинговой оценке биофизическими методами состояния фитопланктонного сообщества с использованием флуоресцентной аппаратуры в 2004-2006 гг. на Черном море и в 2005 г на Балтийском море. Результаты экспериментальных работ по

флуоресцентным параметрам внедрены в гидробиологические исследования, проводимые Институтом океанологии РАН. Предложено использовать проточный флуориметр в практических океанологических исследованиях экологического состояния фитопланктона в обширных акваториях Мирового океана.

Полученные результаты используются в учебном процессе на кафедре гидробиологии и биофизики Биологического ф-та МГУ. Результаты работы привлекаются для чтения лекций и проведения практикума по Экологической биофизике на ЗБС МГУ и на Большом практикуме кафедры биофизики.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы физики на Севере» (Якутск, 2003); на Международной научно-практической конференции «Человечество и окружающая среда» (Москва, 2004); на III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004); на конференции по Биотехнологии – охране окружающей среды (Москва, 2004-2005); на конференции Международной научно-технической конференции по техническим проблемам освоения мирового океана (Владивосток, 2005); на конференции «Биотехнология охраны окружающей среды» (Москва, 2006). Результаты работы были доложены и обсуждены на научных семинарах кафедры гидробиологии МГУ.

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 18 работ, среди которых 1 учебное пособие.

Объем и структура работы: Диссертация изложена на ... стр. и состоит из введения, обзора литературы, изложенных по главам результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, который включает ... источников. Диссертация иллюстрирована ... рисунками и ... таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований служили культуры морских водорослей (*Thalassiosira weissflogii*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*) из коллекции кафедры гидробиологии Биофака МГУ), а также популяции природного фитопланктона из водоемов ЗБС МГУ, Балтийского и Черного морей. Культивирование морских микроводорослей осуществляли в накопительном режиме на среде f/2 medium, приготовленной на искусственной морской воде (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975) в колбах объемом 300 мл при постоянной температуре 20⁰С и периодическом освещении 30 мкЕ/(м²с) в области ФАР люминесцентными лампами дневного света. Продолжительность светового периода составляла 14 ч, темнового - 10 ч.

Измерение параметров флуоресценции хлорофилла в культурах водорослей проводили на бортовом импульсном флуориметре, созданном на кафедре биофизики Биологического ф-та МГУ, аналогичном по принципу действия флуорометрам РАМ- («Walz», Германия), но способном к измерению сильно разбавленных суспензий микроводорослей. Длительность импульсов тестирующего света возбуждения флуоресценции равнялась 4 мкс. При измерении величины F_0 интервал следования тестирующих импульсов был выбран равным 80 мс, а при измерении F_m – 5 мс на фоне секундного мощного освещения. Средняя плотность мощности возбуждающего света при измерении F_0 и F_m равнялась 0,4 и 3000 Вт/м², соответственно, (где F_0 – интенсивность флуоресценции хлорофилла, измеренная при открытых реакционных центрах ФС 2, F_m – интенсивность флуоресценции хлорофилла при закрытых реакционных центрах). Для определения коэффициента нефотохимического тушения у водорослей, предварительно адаптированных к разным условиям освещения, проводились измерения быстрых изменений показателей флуоресценции хлорофилла водорослей под действием постоянного света плотностью 100 мкЕ/(м²с). в течение 10 мин, измеряя показатели флуоресценции хлорофилла в процессе и в течение 10 мин после окончания облучения. Коэффициент нефотохимического тушения вычисляли по формуле $NPQ = F_m/F_m' - 1$ (где F_m' – интенсивность флуоресценции хлорофилла во время насыщающей вспышки, созданной на фоне постоянно действующего света).

На природном фитопланктоне работа проводилась с использованием бортового импульсного флуориметра (на пробах). Для регистрации параметров флуоресценции *in situ*

применяли погружной флуориметр (Маторин и др., 1996) и новый импульсный проточный флуориметр.

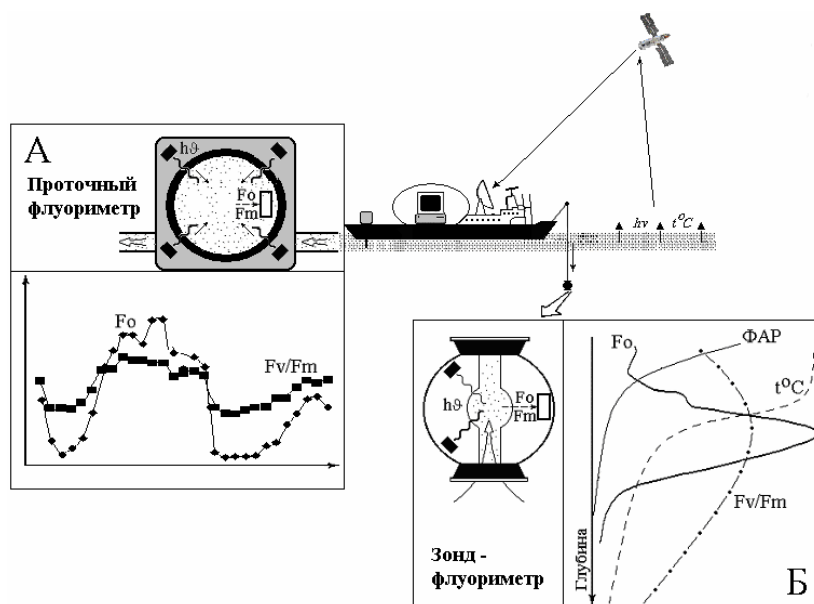


Рис. 1. Схема регистрации зондирования морского фитопланктона с использованием проточной (А) и зондовой (Б) флуориметров. А – схема проточного флуориметра и его регистрируемые параметры F_0 (обилие фитопланктона отн.ед.), F_v/F_m (фотосинтетическая активность), с параллельным снятием координат (JPS) и времени суток; Б – схема зондирования погружным флуориметром с регистрацией параметров флуоресценции F_0 , F_v/F_m , температуры (T^0C), фотосинтетически активной радиации (ФАР).

Погружной зонд-флуориметр предназначен для измерения параметров флуоресценции (F_0 , F_m и $(F_m - F_0)/F_m$) природного фитопланктона в естественных условиях с одновременной регистрацией температуры и подводной облученности по глубине (Рис. 1). Зонд состоит из погружаемого прочного корпуса с электронно-оптической системой измерения, блока питания и IBM совместимого компьютера, управляющего процессом измерений по программе, задаваемой пользователем. Регистрирующая часть зонда состоит из фотоумножителя, усилителя сигналов, аналого-цифрового преобразователя, интерфейса связи с компьютером и двух независимых импульсных источников света с длительностью вспышек 0,01 мс (спектральная область 400–480 нм). Измерение всех параметров производится автоматически и результаты выводятся на экран компьютера в реальном времени по мере погружения аппарата в виде графиков, отражающих вертикальный профиль температуры, подводной облученности, величин F_0 и F_m в относительных единицах, показатель эффективности фотосинтеза водорослей $(F_m - F_0)/F_m$, а также концентрацию хлорофилла «а», рассчитанную по величине F_0 в соответствии с калибровкой.

Нами был разработан и впервые апробирован в экспедиционных условиях импульсный проточный флуориметр (рис. 1). Проточным флуориметром измерялись параметры флуоресценции хлорофилла фитопланктона поверхностных вод по ходу судна. Этот прибор, как и описанный выше зонд-флуориметр и бортовой флуориметр выполняет измерение интенсивности флуоресценции F_0 и F_v/F_m в автоматическом режиме. Подробно конструкция, методические особенности использования проточного флуориметра приведены в главе 3 диссертации.

Токсикологические эксперименты проводили на двухканальном анализаторе квантового выхода флуоресценции хлорофилла ToxY-PAM предназначенном для биотестирования водной среды с высокой точностью в пробе (Schreiber et.al., 2002).

Численность клеток используемых культур водорослей определяли методом прямого счета в камере Горяева при трехкратном заполнении.

Спектры поглощения суспензий микроводорослей регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном интегрирующей сферой (150 мм). В экспедиционных условиях использовался малогабаритный спектрофотометр, разработанный на кафедре биофизики Биологического факультета на базе спектрометра USB 2000 фирмы Ocean Optics (США). Для изучения пигментного состава использовались отфильтрованные и не отфильтрованные пробы а также ацетоновые экстракты из этих проб. Расчет спектров поглощения суспензий, компенсированных на рассеяние, проводили, как описано в работе (Merzlyak M.N., 2000).

Для фотоингибирования фотосинтеза клетки водорослей освещали светом от галогеновой лампы КГМ 150/24. Облучение проводили в кварцевой кювете объемом 5 мл толщиной 6 мм, термостатированной в водяном термостате при 20°C. Плотность потока квантов в области ФАР проводили с помощью квантометра фирмы Walz (Германия).

Для выяснения вклада различных видов тушения возбужденных состояний хлорофилла во флуоресценцию при действии света высокой интенсивности на водоросли проводили эксперименты с использованием ингибиторного анализа. Для выяснения вклада светоиндуцированных изменений состава каротиноидов в величину нефотохимического тушения в антенном комплексе использовали ингибитор 1,4 -дителиотреитол (ДТТ). ДТТ – ингибирует светозависимое превращение ксантофилла виолксантина в зеаксантин. Для выяснения вклада ΔpH в тушение флуоресценции (на мембране тилакоидов) применяли разобщитель FCCP (carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). Для выяснения вклада ресинтеза белков РЦ ФС 2 в процессы восстановления активности после фотоингибирования использовали хлорамфеникол, блокирующий синтез хлоропластных белков, в том числе и белка РЦ ФС 2 – D1. Во всех экспериментах проводили предварительную одночасовую инкубацию клеток с ингибиторами.

В токсикологических экспериментах использовали соли меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и соли ртути ($HgCl_2$ и $MeHg$). Препарат метилртуть хлорида применяли в виде конъюгата с L-цистеином по методике, описанной в работе Hirayama (1985), для обеспечения его активного транспорта внутрь клеток. использовали в виде раствора в 0,1 М.

Исследования сообществ природного фитопланктона *in situ* прибрежных и открытых районов Черного и Балтийского морей были проведены в рейсах на научных судах НИС ЮО ИО им. П.П. Ширшова «Акванавт» и «Ашамба» (2004-2006 гг), и НИС «Океания» в 2004 г.

В экспедициях использовались также методы измерения концентрации хлорофилла, численность клеток, биомассы, фотосинтетической продукции (радиоуглеродный методы) и определения видового состава.

Статистическая обработка, корреляционный анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программ Origin, Excel. Для картографической визуализации данных и сравнения их со спутниковыми данными по поверхности акваторий и вертикальные разрезы применялась программа Surfer.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Главными экологическими факторами, влияющими на физиологическое состояние водорослей в природе, являются свет высокой интенсивности, содержание биогенных элементов в среде и различные виды загрязнений. Однако при исследованиях состояния ФСА фитопланктона в природной среде не всегда бывает невозможно однозначно интерпретировать полученные результаты. Для понимания закономерностей изменений в параметрах флуоресценции фитопланктона в природных условиях необходимо провести исследования на культурах водорослей в контролируемых условиях.

Исследование закономерностей изменений параметров быстрой флуоресценции хлорофилла под действием света повышенной интенсивности у культур диатомовых водорослей и на природном фитопланктоне

Свет определяет интенсивность фотосинтеза, рост и развитие водорослей. В тоже время повышенная интенсивность света может приводить к фотоингибированию (ФИ), вызывать фотоокислительную деструкцию фотосинтетических пигментов и даже гибель организма.

При переносе микроводорослей из темноты на свет наблюдается сложный переходный процесс изменения характеристик фотосинтетического аппарата, изученный в ряде работ (Карапетян, Бухов, 1986; Тихонов, Кукушкин, 1988). Это проявляется в сложных индукционных кривых флуоресценции. Индукционная кривая флуоресценции водорослей после включения света в интервале от мсек до минут имеет несколько фаз, последовательно отражающих включение электронного транспорта, заполнения пула переносчиков между фотосистемами, наработку электрохимического градиента и включение ферментов цикла Кальвина, увеличение потребления продуктов световой стадии в темновых реакциях и установление стационарного состояния процессов.

Процессы, рассмотренные выше, происходят в интервале нескольких минут. Однако, при действии повышенных интенсивностей света могут развиваться более длительные и глубокие перестройки фотосинтетического аппарата, которые отражают развитие процесса ФИ фотосинтеза и включение защитных процессов безизлучательной диссипации избыточной световой энергии. На культуре диатомовых водорослей *Thalassiosira weissflogii* было исследовано влияние света высокой интенсивности ($1100 \text{ мкЕ}/(\text{м}^2\text{с})$) на параметры быстрой флуоресценции и процессы восстановления их после выключения света (Рис. 2). Действие света, по интенсивности близкому к солнечному, приводило к ингибированию F_v/F_m , свидетельствующему об уменьшении активности реакционных центров (РЦ). У культуры, выросшей в нормальных условиях наблюдалось уменьшение F_v/F_m до 0,4. У культур, выросших в условиях дефицита азота исходная активность была понижена и составляла 0,3. После экспозиции на свету это значение снижалось еще ниже. Анализ изменения параметров быстрой флуоресценции, таких как F_0 и F_m при ФИ показал, что у нормальных культур 30 минутное облучение вызывало небольшое увеличение F_0 и значительное снижение F_m , что и приводило к снижению значения F_v/F_m . У культур в условиях дефицита азота наблюдается снижение не только F_m , но и F_0 . Таким образом ответная реакция водорослей на избыточное освещение в оптимальных и неблагоприятных условиях культивирования (дефицит азота) по разному проявляется в изменении параметра быстрой флуоресценции F_0 .

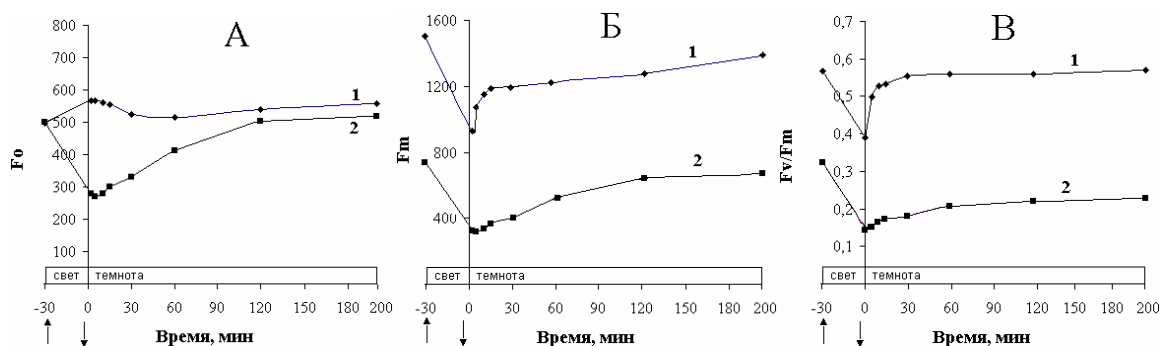


Рис. 2. Изменение параметров флуоресценции F_0 (А), F_m (Б) и F_v/F_m (В) при 30 минутном фотоингибировании светом $1100 \text{ мкЕ}/(\text{м}^2\text{с})$ и последующем восстановлении в темноте. Культура *T. weissflogii*, выросшая в нормальных условиях (1) и при дефиците азота (2). Стрелками вверх и вниз отмечены моменты включения и выключения света, соответственно.

После выключения света развиваются процессы восстановления фотосинтетической активности, что отражается на параметрах флуоресценции. На кривой восстановления после ФИ выделяют быстрые и более медленные компоненты восстановления параметров быстрой флуоресценции (рис. 2). Восстановление F_v/F_m после ФИ у культур, выросших в оптимальных условиях, происходило через 40 минут темновой адаптации. При нехватке биогенных элементов происходит более медленное и неполное восстановление активности F_v/F_m . Это указывает на наличие процессов необратимого повреждения РЦ ФС2 и неспособности клеток восстановиться после ФИ интенсивным светом. В кинетике темнового восстановления F_v/F_m отсутствовала быстрая фаза репарации.

Увеличение времени освещения от 30 до 60 мин приводило к более сильному ФИ и изменению параметров флуоресценции. После 60 минутного освещения активность

фотосинтеза по F_v/F_m клеток с дефицитом азота сильно ингибировалась с 0,34 до 0,02, что характерно для клеток с глубокими повреждениями пигмент-белковых комплексов ФС2. После темновой адаптации эти клетки не восстанавливались до исходного значения по всем показателям флуоресценции.

Известно, что (Рубин, Кренделева, 2003) для защиты от окислительных повреждений фотосинтетического аппарата в антенном комплексе и реакционном центре может происходить целый ряд процессов, вызывающие увеличение вероятности безизлучательной диссипации энергии возбужденных пигментов фотосистемы 2, т.н. нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла. Оно может включать в себя: энергизационное тушение, тушение, обусловленного миграцией электронного возбуждения от хлорофилла к молекулам каротиноидов, тушение в результате светового повреждения (фотоокисления) самого реакционного центра фотосистемы 2.

В исследованиях адаптации фотосинтеза водорослей, связанной с развитием нефотохимического тушения при действии света нами было предложено определять коэффициент тушения на импульсном флуориметре при дополнительном освещении постоянным светом $100 \text{ мкЕ}/(\text{м}^2\text{с})$. Такой свет неспособен вызвать необратимых повреждений ФСА, но превышает по своей интенсивности свет при выращивании культур. На этом свете хорошо проявляются быстрые адаптационные возможности водорослей, связанные с тушением избыточной световой энергии. Коэффициент нефотохимического тушения вычисляли по формуле $\text{NPQ} = F_m/F_m' - 1$.

С использованием ингибиторного анализа исследован вклад разных компонентов нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла на параметры флуоресценции *T. weissflogii* при фотоингибировании. Показано, что при действии ингибитора дезпоксидазы каротиноидов диадиноксантинового цикла ДТТ, разобщителя FCCP, происходит снятие нефотохимического тушения, усиление процесса ФИ и появление необратимых фаз повреждения клеток при повышенных освещенностях.

На природном фитопланктоне Черного моря нами было показано, что ингибитор синтеза белка - хлорамфеникола замедляет процессы репарации, по-видимому, действуя на белоксинтетические процессы у фотоингибированного природного фитопланктона.

Полученные выше закономерности действия света, выполненные на культурах водорослей, были сопоставлены с наблюдениями на природном фитопланктоне из Стерляжьего пруда ЗБС МГУ. На рис. 3 представлена степень ингибирования F_v/F_m и изменение солнечной активности проб, взятых в разное время суток. Видно существенное ингибирование фотохимической активности РЦ ФС 2 в 12-15 часов. При этом степень фотоингибирования коррелирует с кривой увеличения фотосинтетически активной радиации в дневные часы. Значения фотосинтетической активности (F_v/F_m), восстанавливаются в вечернее время при снижении освещенности (Рис. 3).

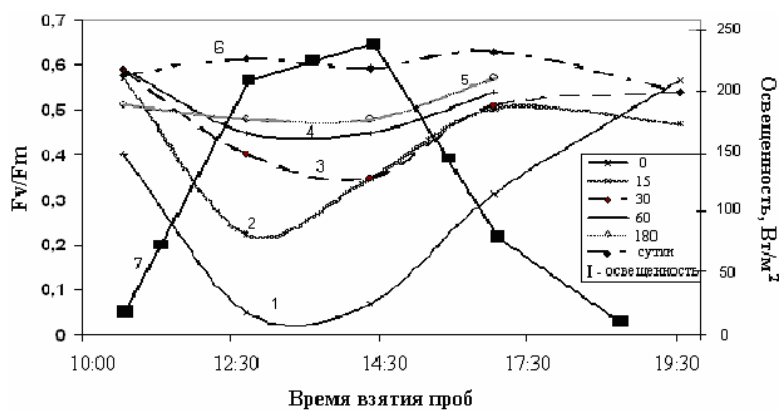


Рис. 3. Изменение интенсивности дневного освещения ($\text{Вт}/\text{м}^2$) (7) и восстановление в темноте фотосинтетической активности (F_v/F_m) проб, отобранных в Стерляжьем пруду в разное время суток (1) – измерение сразу после взятия пробы; (2) – через 15 минут; (3) - 30 минут; (4) - 1 час; (5) - 3 часа; (6) - и через сутки, соответственно.

Снижение активности фотосинтетических процессов под воздействием избыточного света может быть обратимым и необратимым. Быстрое, в течение 30 минут, обратимое восстановление после прекращения избыточного освещения обусловлено регуляторными механизмами, предотвращающими поступление возбуждения к реакционным центрам за счет увеличения тепловой диссипации возбужденных состояний хлорофилла. Медленное, в течение нескольких часов, восстановление работы фотосинтетического аппарата после фотоингибирования связано с процессами ресинтеза белков реакционного центра ФС2. Степень необратимого фотоповреждения возможно определить по параметрам флуоресценции после суточной темновой адаптации.

Из рисунка 3 видно, что при выдерживании всех проб в темных условиях происходит процесс полного обратимого восстановления фотосинтетической активности после ФИ. Это позволяет сделать вывод, что у проб природного фитопланктона из Стерляжьего пруда существует только обратимое фотоингибирования, и они не повреждаются солнечным светом. То есть по показаниям флуоресцентного датчика, возможно, оценить степень влияния инсоляции на водоросли, устойчивость их к повышенным освещенностям и появление необратимых повреждений.

Изменение характеристик флуоресценции у водорослей в условиях разного фона минерального питания

В природных условиях по мере развития водорослей и изъятия ими ресурсов из среды клетки часто испытывают дефицит тех или иных биогенов, в частности, азота. Недостаток минерального азота в культуральной среде может не только тормозить рост водорослей, но и вызывать целый ряд адаптивных перестроек, обеспечивающих выживание в неблагоприятных условиях. Ранее отмечалось (Kolber et al., 1988), что одной из реакций фотосинтетического аппарата на недостаток минерального питания в культурах микроводорослей является снижение активности ФС 2. В работе (Чемерис и др., 1990) на зеленых пресноводных водорослях обнаружено, что инактивация ФС 2, измеренная по уменьшению F_v/F_m , связана с увеличением выхода F_o и обусловлена ингибированием переноса электронов от Фео на хинон Q_a в РЦ ФС 2.

Нами был смоделирован процесс азотного голодания и последующего восстановления фотосинтетической активности при добавлении различных форм азот содержащих веществ (мочевина, глицин, нитраты и аммоний). На рис. 4. представлены изменения параметров флуоресценции и численности клеток в зависимости от времени роста азотдефицитной культуры *T. weissflogii* при пересеве на среду $f/10$. Клетки в начальный момент времени в результате азотного голодания имели низкое значение фотосинтетической активности F_v/F_m . При добавлении в среду азота в прописи $f/10$ (разбавленная в 5 раз нормальная среда $f/2$) у клеток наблюдалось увеличение активности F_v/F_m . Однако в первые сутки численность клеток мало изменялась. При достижении клетками фотосинтетической активности $F_v/F_m = 0,4$ и выше наблюдается рост количества клеток. Значение F_o и F_m также увеличиваются, в связи с тем, что увеличивается плотность культур. Важно отметить, что росту клеток и увеличению параметров флуоресценции, предшествует увеличение переменной флуоресценции F_v/F_m . Подобная картина увеличения активности РЦ ФС2 по F_v/F_m отмечалась нами и другими авторами (Antal et.al., 2001) для природного фитопланктона в период предшествующему цветению водорослей. Анализ изменения параметров показал, что увеличение F_v/F_m в первые сутки происходило за счет уменьшения величины F_o , тогда как F_m не менялось в течении первых 3-4 суток. С уменьшением F_o падало в первые сутки значение F_o на клетку - рассчитанной как F_o/N , где N количество клеток. В последующие дни это отношение мало изменялось, что свидетельствует об положительной корреляции между параметром F_o и количеством клеток в процессе роста.

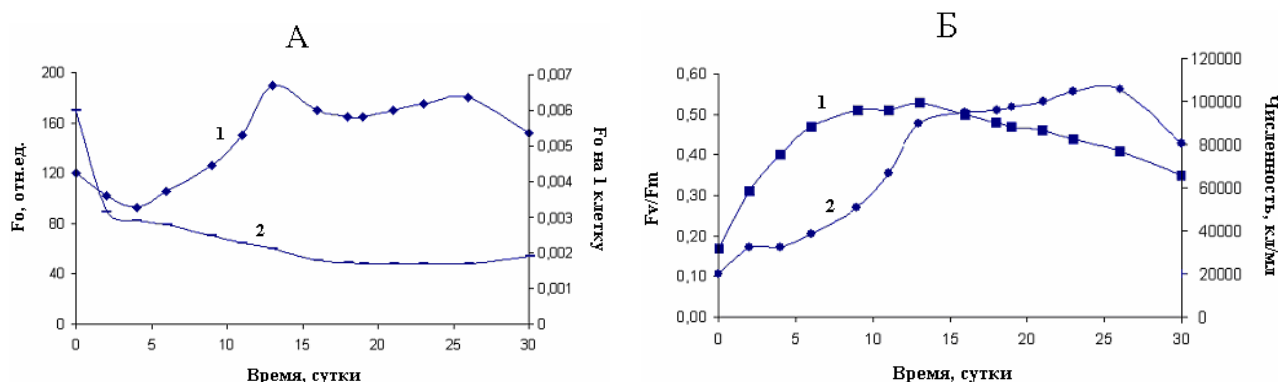


Рис. 4. Изменение параметров флуоресценции. А- F_o (1) и F_o на одну клетку (2), Б - F_v/F_m (1) и численности клеток (2) в зависимости от времени роста культуры *T. weissflogii*. после добавления среды f/10.

Общие закономерности изменения параметров флуоресценции с увеличением F_v/F_m и изменением F_o наблюдались нами в экспериментах с разными добавками органического азота к культуре *Pseudo-nitzschia delicatissima*. Было показано, что все добавки резко стимулируют рост культуры водорослей.

После добавок органических источников азота – мочевины и глицина к азот лимитированной культуре наблюдалось повышение F_v/F_m не уступающее степени увеличения этих параметров у водорослей, ассимилировавших минеральный азот. Различия в динамике флуоресцентных параметров у водорослей, росших с использованием органического и минерального азота, начали проявляться после 16 часов после внесения добавок (таблица). Увеличение квантовой эффективности РЦ ФС 2 у азот лимитированных водорослей после внесения добавок мочевины и глицина свидетельствует о том, что за счет потребления и ассимиляции этих субстратов идет восстановление фотосинтетического аппарата. Этот феномен у водорослей с эффективным восстановлением фотосинтетического аппарата за счет ассимиляции мочевины и глицина может указывать на возможность формирования летнего цветения диатомей за счет их способности к ассимиляции азот содержащих органических субстратов.

Таблица 2. Динамика квантовой эффективности РЦ ФС 2 (F_v/F_m), постоянной (F_o) и максимальной (F_m) флуоресценции *Pseudo-nitzschia delicatissima* от времени роста культуры после внесения добавок.

Т, ч	Мочевина			Глицин			Нитраты		
	F_o	F_m	F_v/F_m	F_o	F_m	F_v/F_m	F_o	F_m	F_v/F_m
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	306	332	0,08	314	332	0,06	289	313	0,07
14	298	334	0,11	293	325	0,10	282	311	0,09
16	269	314	0,14	295	335	0,12	277	311	0,11
18	279	344	0,19	328	385	0,15	283	329	0,14
20	268	343	0,22	330	403	0,18	283	342	0,17
24-34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	247	397	0,38	288	410	0,30	226	326	0,31
38	348	545	0,36	377	526	0,28	314	462	0,32
40	378	627	0,40	440	625	0,30	348	523	0,33
42	422	738	0,43	476	702	0,32	368	584	0,37
Т, ч	NH ₄ Cl			Контроль					
	F_o	F_m	F_v/F_m	F_o	F_m	F_v/F_m			
0	-	-	-	-	-	-			
0-10	-	-	-	-	-	-			
12	291	316	0,08	273	296	0,08			
14	318	348	0,08	273	300	0,09			
16	265	297	0,11	274	303	0,09			

18	269	310	0,13	263	291	0,10
20	262	311	0,16	267	296	0,10
24-34	-	-	-	-	-	-
36	220	322	0,32	190	219	0,13
38	333	490	0,32	249	276	0,10
40	361	568	0,36	239	269	0,11
42	395	649	0,39	241	272	0,11

Примечание-

■ - Промежуток времени, на который приходился темновой период

(-) - измерения не проводили

T – время после внесения добавок

Приведенные выше данные доказывают, что использование параметров флуоресценции позволяет с высокой эффективностью оценивать степень голодания клеток микроводорослей и регистрировать изменения их состояния при появлении в среде азотсодержащих веществ и тем самым делать некоторые прогнозы относительно увеличения ростовых процессов у природного фитопланктона.

Влияние загрязнений солями ртути и меди на параметры флуоресценции водорослей

Одним из распространенных загрязнений водной среды являются соли тяжёлых металлов, которые попадая в водоемы оказывают токсическое действие на фитопланктон. Нами были проведены токсикологические исследования на культурах морских водорослей, с тремя представителями наиболее часто встречающимися в природе солями тяжелых металлов: сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), хлорида ртути (HgCl_2) и метилртути (MeHg).

Действие солей ртути на клетки *T. weissflogii* проявлялось в снижении переменной флуоресценции хлорофилла Fv/Fm. Наблюдаемое снижение величины Fv/Fm было связано в основном с уменьшением величины Fm, что характерно для процесса фотоингибирования ФС 2. Экспоненциальному снижению Fv/Fm до нулевого уровня предшествовала короткая лаг-фаза, обусловленная накоплением действующей концентрации токсиканта внутри клеток. Аналогичный эффект наблюдали при добавлении такой же концентрации HgCl_2 , а также при действии соединений ртути в темноте.

Были определены концентрации MeHg и HgCl_2 вызывающие снижение активности ФС 2 в клетках водорослей. Необходимо отметить, что метилртуть в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-7} М не приводила к полной инактивации ФС 2. Так, при действии 10^{-6} М MeHg величина Fv/Fm снизилась в течение нескольких суток от 0.62 до 0.08 и стабилизировалась на этом уровне. Проведенный в этих условиях предварительный микрофлуорометрический анализ показал, что небольшая часть клеток сохранила высокую активность ФС 2, в то время как у остальных клеток центры ФС 2 были либо полностью инактивированы, либо обладали остаточной активностью. Присутствие в культуре фотосинтетически активных клеток может свидетельствовать об их резистентности в целом к действию токсиканта и их возможном участии в дальнейшем развитии популяции. Действительно, при действии 10^{-7} М MeHg отношение Fv/Fm сначала медленно уменьшилось с 0.62 до 0.15, после чего постепенно в течение нескольких суток возросло до 0.40, что может быть результатом частичной адаптации водорослей к неблагоприятному воздействию (Гапочка, 1981). Полученный микрофлуорометрическим методом результат согласуется с предположением, согласно которому гидробионты могут приспосабливаться к действию тяжелых металлов путем сохранения уже имеющихся резистентных особей и элиминации слабоустойчивой части популяции (Флеров, 1971).

Фотоингибирование фотосинтеза, связанное с развитием фотоокислительного стресса в клетках, подвергнутых интенсивному освещению, может усиливаться при действии неблагоприятных факторов различной природы, в том числе при токсическом воздействии (Rheil, Krupinska, Wehrmeyer, 1986; Маторин, 2000). Глубокое фотоингибирование фотосинтеза связано в основном с фотоокислением D1-белка РЦ ФС2. Восстановление активности ФС 2

сопровождается ресинтезом этого белка в хлоропласте (Аго, 1993). Очевидно, что концентрация активных центров ФС 2 в клетках зависит от соотношения скоростей ее фотоокислительной деструкции и репарации, которые могут быть определены по снижению величины F_v/F_m на интенсивном свете и ее последующей релаксации в темноте, соответственно.

Как упоминалось выше, в темноте хлорид ртути в концентрации 10^{-6} М не влиял на активность ФС 2 в клетках *T. weissflogii*, а метилртуть начинала подавлять активность центров ФС 2 только через несколько суток. Однако при инкубации клеток в условиях повышенной освещенности действие солей ртути на активность ФС 2 проявлялось уже через несколько часов. На рис. 5 показаны изменения величины F_v/F_m в культуре при повышенной освещенности ($220 \text{ мкЕ}/(\text{м}^2\text{с})$) и последующей темновой экспозиции клеток. Как видно из рисунка, в обработанных ртутью образцах значительно замедлялась скорость темнового восстановления величины F_v/F_m по сравнению с образцом, подвергнутым интенсивному освещению в отсутствие токсикантов. Этот результат свидетельствует о возможном подавлении ртутью процесса репарации фотоповрежденных центров ФС 2 в клетках водорослей.

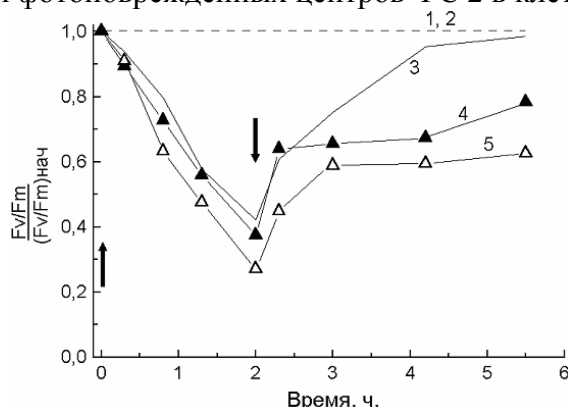


Рис. 5. Изменения величины F_v/F_m в обработанных хлоридом ртути и метилртутью клетках *T. weissflogii* при экспонировании их на свете и в последующий темновой период. 1, 2 – клетки инкубировали в присутствии 10^{-6} М HgCl_2 и MeHg , соответственно, в темноте; 3, 4, 5 – клетки инкубировали при интенсивности $220 \text{ мкЕ}/\text{м}^2\text{с}$. Стрелками показаны моменты включения и выключения света. 3 – образец, не содержащий солей ртути, 4 – в присутствии 10^{-6} М HgCl_2 , и 5 – в присутствии 10^{-6} М MeHg . Интенсивный свет включали через 20 мин после добавления солей ртути. Концентрация клеток в суспензии составляла $600 \text{ тыс. кл мл}^{-1}$.

Как известно, величину нефотохимического тушения флуоресценции q_N , связанного с фотосинтетической энергизацией мембран при действии света, можно оценить методом РАМ (Schreiber et.al., 1996). Было показано также с использованием метода РАМ, что хлорид ртути 10^{-6} М и метилртуть 10^{-6} М увеличивали нефотохимическое тушение флуоресценции на свету за счет увеличения вклада энергизационного компонента внутритилакоидного рН вследствие нарушения процессов фосфорилирования в присутствии ртути.

Результаты проведенных исследований доказывают высокую чувствительность ФС 2 диатомовой водоросли *T. weissflogii* к действию хлорида ртути и метилртути, причем последняя обнаружила большую токсичность при низких концентрациях. Оба вещества показали способность снижать активность ФС 2, в том числе в результате ингибирования процесса репарации фотосистемы. Последнее может играть существенную роль в снижении фотосинтетической активности клеток при действии низких концентраций ртути в условиях фотоокислительного стресса.

Феномен усиления токсического действия солей тяжелых металлов в присутствии освещения был нами также подтвержден и в опытах с сульфатом меди. Анализ кривых восстановления F_v/F_m после ФИ клеток обработанных солями меди в сублетальных концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} М, показал, что восстановление полностью ингибировано. Это подтверждает, что при этих концентрациях меди водоросль *T. weissflogii* теряла способность восстанавливать поврежденный фотосинтетический аппарат. Добавление в этих концентрациях солей меди в темноте существенно не изменяли F_v/F_m . На свету процессы фотодеструкции и репарации протекают одновременно, и степень ингибирования фотосинтетического аппарата зависит от соотношения их скоростей (Green, 1988). Очевидно, что действие меди вызывает

сдвиг баланса скоростей в сторону фотодеструкционных процессов, что приводит к снижению величины F_v/F_m .

Полученные результаты продемонстрировали, что методы регистрации флуоресценции хлорофилла могут быть использованы для обнаружения действия солей ртути и меди на водорослевые сообщества. Фотосинтетическая активность водорослей, оцениваемая по F_v/F_m , является более экспрессным параметром, чем относительная численность клеток, так как позволяет достоверно обнаруживать присутствие токсических агентов на более ранних стадиях интоксикации. Поскольку снижение F_v/F_m приводит к замедлению скорости роста водорослей, это обуславливает все большее отставание водорослей по численности в опытах по сравнению с контролем в ходе инкубирования. Обнаруженное нами резкое усиление токсикологического эффекта на свету может служить предупреждением: в случае загрязнения поверхностных вод тяжёлыми металлами даже на уровне узаконенных ПДК даже обычный дневной свет может стать активным повреждающим фактором, снижающим активность фотосинтеза фитопланктона. Как следствие снизится первичная продукция экосистемы водоемов; это неизбежно «ударит» по следующим уровням пищевой пирамиды.

Изучение изменений параметров флуоресценции у природного фитопланктона в разных условиях на примере Черного и Балтийского морей с использованием проточного и погружного флуориметров

Для работы с природным фитопланктоном был использован комплекс флуоресцентной аппаратуры, включающий в себя разработанный нами проточный флуориметр, предназначенный для измерения параметров быстрой флуоресценции хлорофилла фитопланктона поверхностных вод, бортовой флуориметр для исследования флуоресцентных показателей в пробах воды, погружной зонд-флуориметр для определения обилия и состояния ФСА фитопланктона во всем эвфотическом слое. Выяснение состояния фитопланктонного сообщества больших морских акваторий невозможно без информации о распределении обилия водорослей в водном столбе и их фотосинтетической активности. Особенно важно получать такие данные по ходу судна с целью обнаружения градиентных зон и выбора станций для проведения детальных обследований фитопланктона. Такой подход позволяет определить пространственную структуру фитопланктонного сообщества и оценить его функциональное состояние. Большой массив данных, получаемых по ходу судна, позволяет сопоставить их со спутниковыми картами распределения хлорофилла в море. Такое сопоставление может способствовать уточнению алгоритмов расчетов содержания хлорофилла по показателям спектральной яркости, получаемой со спутников.

Нами был разработан проточный импульсный флуориметр. Он предназначен для измерения параметров флуоресценции хлорофилла фитопланктона приповерхностных вод по ходу судна. Этот прибор выполняет в автоматическом режиме измерение интенсивности флуоресценции F_0 , которая соответствует обилию фитопланктона, и безразмерную величину F_v/F_m , показывающую эффективность утилизации света в фотосинтетическом аппарате водорослей. По характеристикам и параметрам флуориметрического блока измерения и регистрации данный прибор аналогичен бортовому флуориметру, описанному в методике. F_0 регистрируется в режиме при котором слабые повторяющиеся импульсы возбуждающего света от светодиодов не влияют на состояние фотосинтетического аппарата, длительность импульсов выбирают 5 мкс, интервал между импульсами - 50 – 100 мс. F_m -максимальный уровень флуоресценции достигается через 10-20 мс при облучении дополнительным светом в конце 200-1000 мс и при мощности облучения не менее 3000 мкЕ/м²с.

Отбор воды и ее доставку к прибору проводили силиконовым шлангом. Шланг с цилиндрическим фильтром на конце (диаметр отверстий фильтра 0,5 мм, длина 10 см) помещали в металлическую трубу, которая была вынесена за борт судна вблизи миделя. Приемный фильтр был погружен в воду на 40-50 см. Проток воды обеспечивали за счет разряжения, создаваемого водоструйным насосом, размещенным за измерительной камерой прибора. Прошедшая через измерительную камеру вода стекала в водоструйный насос. Для работы водоструйного насоса использовали электронасос мощностью 400 Вт, прокачивающий морскую воду по замкнутому контуру. Проведенные параллельные исследования на бортовом приборе показали, что при такой системе не происходит повреждения фотосинтетического

аппарата клеток водорослей. Измерительная камера прибора имеет объем 200 мл и обеспечивает отвод пузырьков воздуха из зоны измерения. Скорость протока воды составляла 0,5 л/мин. Измерение параметров флуоресценции проводили в автоматическом режиме 1 раз в мин. Цикл измерений величин F_o и F_v/F_m занимал 10 с.

Для работы на проточном флуорометре была отработана специальная программа для регистрации в автоматическом режиме параметров флуоресценции и координат и построение графиков. Проточный флуорометр оснащен датчиком GPS для определения и регистрации координат и времени. На рис. 6 представлены типичные примеры измерения флуоресцентных параметров (F_o и F_v/F_m), полученные на проточном флуорометре в Черном море и при ночном переходе через Гданьскую бухту от порта стоянки судна до выхода из бухты. Хорошо видно, что в районе порта и, особенно, в районе выноса вод реки Висла увеличивается как количество по F_o , так и фотосинтетическая активность (F_v/F_m) фитопланктона, что, естественно, связано с выносом биогенов. В остальной акватории залива также наблюдались достаточно высокие значения этих параметров. Масса фитопланктона по концентрации хлорофилла, определенное прямым спектрофотометрическим методом и по откалиброванной флуоресценции, колебалась в поверхностных водах залива от 20 до 5 мкг/л. Следует отметить определенную корреляцию между параметрами флуоресценции хлорофилла F_v/F_m и F_o , которая показывает, что в весенний период цветения высокая фотосинтетическая активность также может реализоваться в интенсивном росте фитопланктона. Кроме того, измерения на проточном флуориметре с высокой достоверностью демонстрируют пространственную неоднородность распределения и фотосинтетической активности фитопланктона поверхностных вод Гданьского залива.

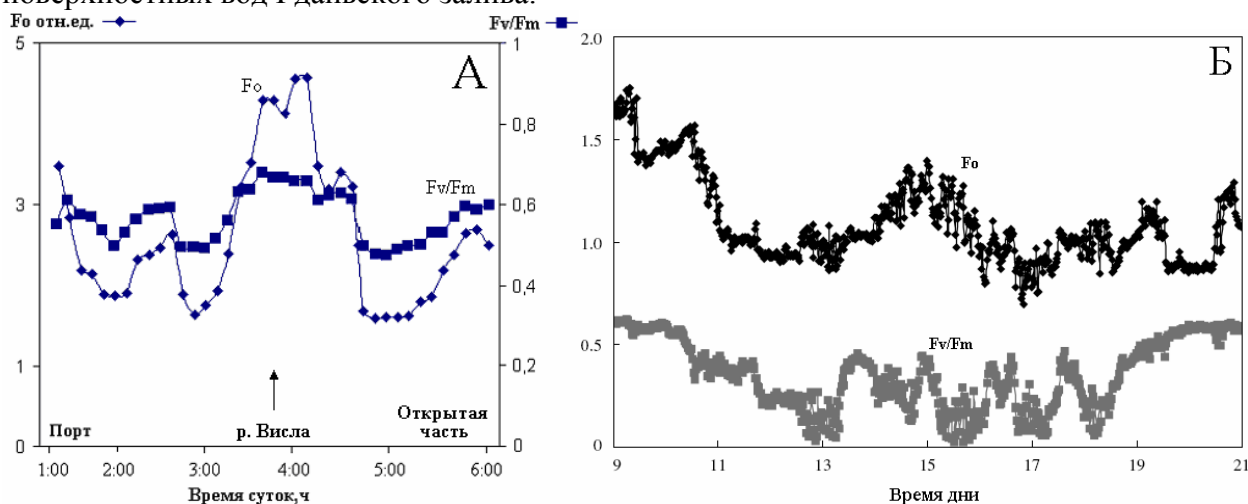


Рис. 6. Кривые изменения параметров флуоресценции F_o (отн.ед.) и F_v/F_m фитопланктона. А – во время рейса НИС «Океания» в Балтийском море, и Б - во время рейса 61 НИС «Акванавт» на Черном море к станции 1660 расположенный на расстоянии 55 миль от 1651 станции. Измерения сделаны проточным флуорометром.

В поверхностных водах в дневные часы под влиянием солнечного света могут происходить существенные изменения в функционировании фотосинтеза водорослей и, соответственно, в параметрах флуоресценции (Маторин и др., 1992). Эти процессы, известные как процессы полуденной депрессии фотосинтеза или ФИ, обусловлены нефотохимическим тушением возбужденных состояний хлорофилла (Falkowski, Raven, 1997). На рис.7 представлены результаты измерения флуоресценции фитопланктона во время стоянки судна на ст. Р1 с 5³⁰ утра до 13³⁰ часов дня методом проточной флуориметрии. В утренние часы (6 до 8 часов) при низкой освещенности не происходило изменений F_o , хотя параметр F_v/F_m несколько уменьшался. При сильном увеличении солнечной инсоляции в дневные часы наблюдалось снижение F_o , которое сопровождалось дальнейшим уменьшением фотосинтетической активности по F_v/F_m . Значительный спад флуоресценции F_o при интенсивном освещении был ранее описан нами на культурах микроводорослей при недостатке

азота. При снижении освещенности в вечернее время происходило восстановление значения F_0 и F_v/F_m . Величина уменьшения F_0 в дневные часы зависела от освещенности. В пасмурные дни с переменной облачностью наблюдалось слабое изменение параметра F_0 в дневные часы (рис. 7.Б.).

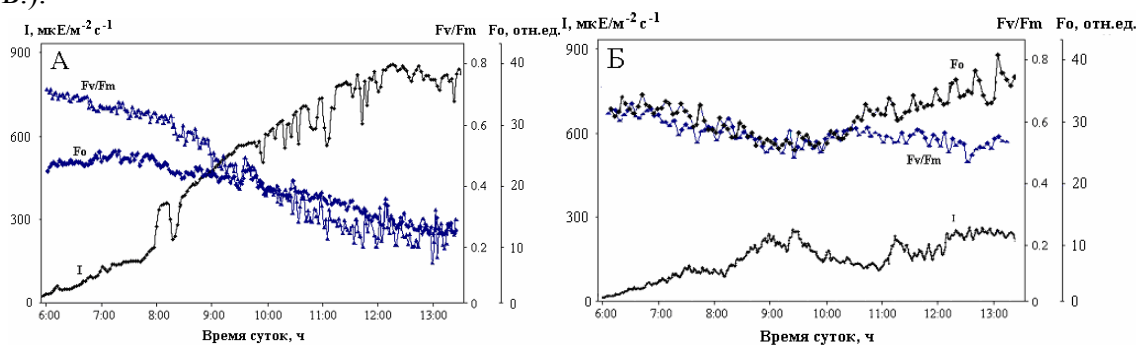


Рис. 7. Кривые изменения освещенности I ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) и параметров флуоресценции F_0 (отн.ед.) и F_v/F_m микроводорослей в дневные часы А – в солнечный на ст. Р1 и Б – пасмурный день на ст. Р3 в Балтийском море. Измерения сделаны проточным флуорометром *in situ* в непрерывном режиме.

Степень ФИ и снижения F_0 может существенно различаться для фитопланктона в различных условиях. В связи с этим при определении обилия фитопланктона по показаниям флуоресцентных датчиков в дневные солнечные часы необходимо учитывать влияния инсоляции на флуоресценцию фитопланктона данного района путем введения поправочных коэффициентов. Для этого следует проводить адаптацию фитопланктона в темноте и исследовать процессы восстановления F_0 после интенсивной инсоляции. Время восстановления значений F_0 после помещения проб воды в темноту для нескольких станций в Балтийском море составляло несколько часов. Эксперименты с добавлением ингибитора синтеза хлоропластных белков хлорфеникола показали, что процесс восстановления значений F_0 в клетках фитопланктона в значительной степени обусловлен ресинтезом хлоропластных белков. То есть избыточное освещение приводит к повреждению части белков РЦ фотосинтетического аппарата водорослей, что и вызывает процессы нефотохимического тушения флуоресценции F_0 .

Одним из важных показателей адаптационных и репарационных возможностей фитопланктонного сообщества является скорость релаксации фотосинтетического аппарата в исходное состояние после действия интенсивного света. Чем выше эта скорость, тем большими адаптационными и репарационными возможностями располагают водоросли. Было обнаружено, что водоросли верхнего горизонта после высокой инсоляции нуждаются в репарации белков реакционных центров. Блокирование системы синтеза белка у этих водорослей приводило к тому, что фотосинтетический аппарат не приходил в исходное состояние. При этом блокирование системы синтеза белка водорослей, взятых с того же горизонта ночью или ранним утром, не изменяло состояния их фотосинтетического аппарата в течение 10-12 часов. Следует отметить, что индуцированные светом изменения состояния фотосинтетического аппарата фитопланктонного сообщества в обследованной акватории происходят только до глубин не более 10 м. На показателях флуоресценции хлорофилла это отразилось в приблизительно 40% снижении измеренного днем значения F_0 и пониженной в это же время величине F_v/F_m .

Следует отметить, что параллельное использование бортового флуориметра с дополнительным освещением постоянным светом, позволяет оценить светочувствительность проб фитопланктона в разных районах и по горизонтам. На рис 8 видно, что у глубинного теневого фитопланктона с 40 метров более значительно уменьшается F_v/F_m и увеличивается значение нефотохимического тушения флуоресценции NPQ на свету ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) по сравнению с поверхностными пробами.

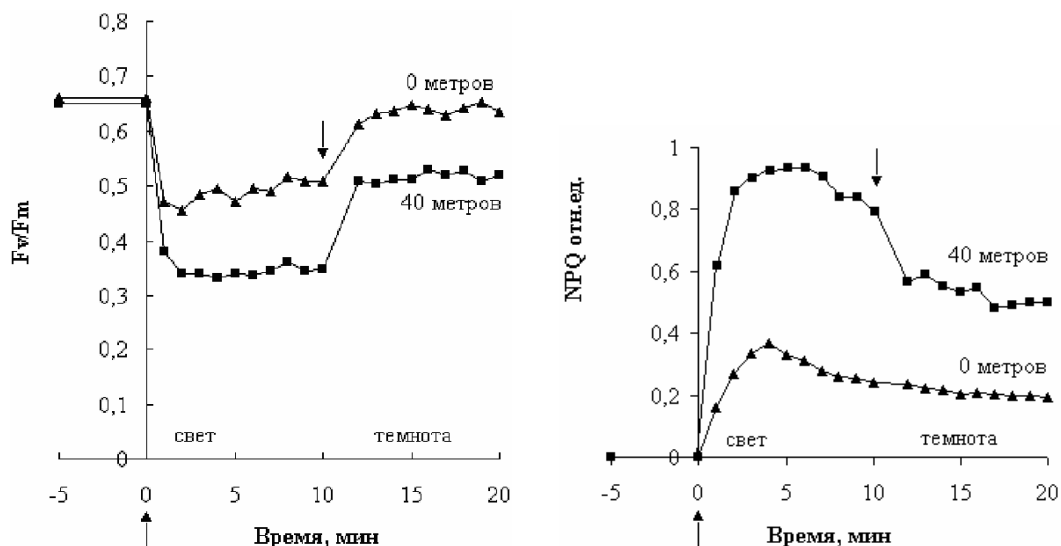


Рис. 8. Изменение F_v/F_m и нефотохимического тушения NPQ флуоресценции проб фитопланктона взятых из разных горизонтов (0 и 40 метров) при действии светом $100 \text{ мкЕ/м}^2 \cdot \text{с}$ в течении 10 минут и последующая релаксация в темноте. Рейс 61 НИС «Акванавт» на Черном море. Стрелками показаны моменты включения и выключения света.

Спутниковые наблюдения и исследования с использованием проточного флуориметра ограничены только определением фитопланктона в поверхностном слое. Использование погружаемого импульсного зонда-флуорометра, разработанного на кафедре биофизики МГУ, дает возможность связать изменения гидродинамических структур поверхностных вод с изменениями физиологического состояния фитоценоза в толще водной массы *in situ*.

С помощью погружного зонда на станциях в Балтийском море во время весенней экспедиции зарегистрированы глубинные профили параметров флуоресценции и температуры. В Гданьской бухте температура в поверхностном горизонте в этот период составляла $5-6^\circ\text{C}$ и резко понижалась до $1-2^\circ\text{C}$ на глубине 10-60 м. В более глубоких слоях происходило повышение температуры. В открытой части моря характер изменения температуры имел аналогичный вид, однако поверхностные воды, по-видимому, еще мало прогрелись и температура их была ниже на несколько градусов по сравнению с бухтой. В Гданьской бухте в поверхностном слое наблюдалась высокая фотосинтетическая активность по переменной флуоресценции (F_v/F_m), что, как правило, соответствовало большому обилию фитопланктона. Это характерно для квазистационарных условий существования популяции фитопланктона (минеральное питание, температурный и световой режим). В более глубоких слоях с понижением температуры наблюдалось резкое снижение количества фитопланктона, однако клетки обладали достаточно высокой активностью. Эта ситуация типична для начальной фазы сукцессии фитоценоза, когда высокая эффективность фотосинтеза еще не реализовалась в высокой величине биомассы. Подобный эффект отмечался нами и для некоторых близких к берегу станциях в открытых районах моря. По-видимому, появление клеток с высокой активностью в этих условиях может указывать на возможность увеличения обилия клеток и вероятного начала цветения водорослей в этих водах. С другой стороны на культурах микроводорослей нами ранее показано, что при низкой активности первичных реакций фотосинтеза, регистрируемой по переменной флуоресценции F_v/F_m в неблагоприятных условиях роста наблюдается низкая скорость роста клеток. В открытой части моря были выявлены районы, где наблюдалась низкая эффективность фотосинтеза при низких значениях обилия фитопланктона, что соответствует неблагоприятным условиям роста клеток, которые, по-видимому, еще находились в состоянии зимнего покоя.

Ниже приведены примеры исследования фитопланктона Черного моря в 61 рейсе с использованием спутниковых данных по цветности, пересчитанные на содержания хлорофилла «а» (А) и температуру (Б) в поверхностных водах и данные, полученным с использованием погружаемого импульсного зонда-флуорометра. На рис. 9 представлены распределения по глубине обилия фитопланктона и эффективности функционирования его фотосинтетического

аппарата на трех разрезах в северо-восточной части Черного моря, выполненных в 61 рейсе НИС «Акванавт» при помощи зонда-флуорометра. Приведенные содержания хлорофилла были рассчитаны на основании калибровки по флуоресценции культур морских диатомовых водорослей

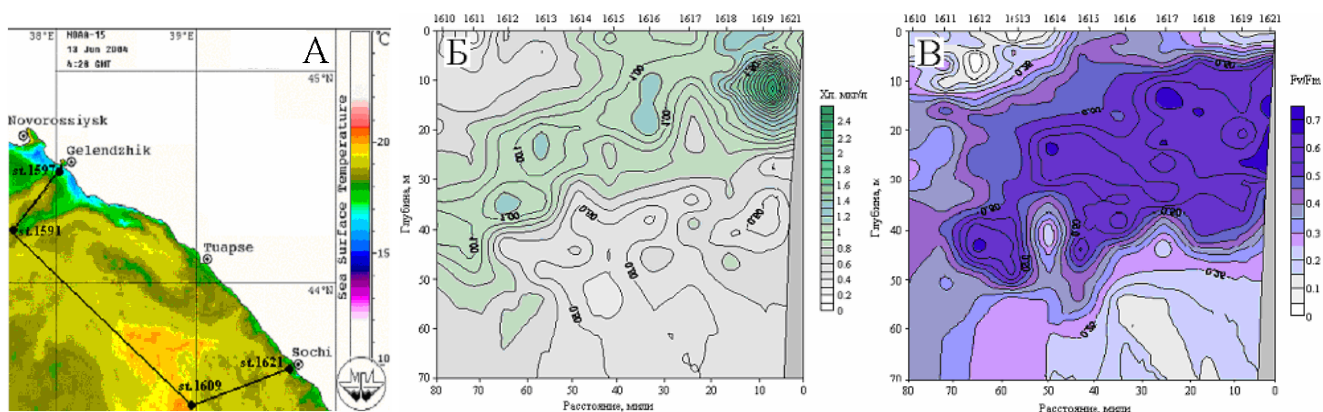


Рис. 9. Изменения температуры поверхностного слоя (А) по данным спутникового зондирования, концентрации хлорофилла, рассчитанного по параметрам флуоресценции F_0 (Б) и активности фитопланктона F_v/F_m (В) по глубине. Данные получены погружным флуориметром. Рейс 61 НИС «Акванавт» на Черном море. Южный разрез - станции 1610 - 1621. (июнь 2004). На рис. А приведен маршрут экспедиции.

Количественное распределение фитопланктона по глубине имеет один или два максимума на глубине 12-15 метров вблизи берега и 35-40 м в открытом море. Значения эффективности работы фотосинтетического аппарата, как правило, имеют максимумы на тех же глубинах. Наиболее низкие значения F_v/F_m обнаружены в верхних слоях воды открытого моря. Также низкими значениями эффективности фотосинтеза характеризуются водоросли на глубинах более 60 м.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотоокислительное повреждение фотосинтетического аппарата (ФСА) водорослей может происходить под влиянием избыточного освещения, что характерно для поверхностных вод. При этом, как показывают и наши опыты, многие неблагоприятные факторы среды, в частности, недостаток минерального питания или загрязнения могут резко усилить это повреждение. В этих случаях повреждение ФСА может происходить под действием небольших естественных интенсивностей света. Таким образом, действие света высокой интенсивности на ФСА водорослей может служить индикатором влияния других неблагоприятных факторов, нарушающих электронный транспорт в ФСА.

На начальных этапах действие света высокой (насыщающей фотосинтез) интенсивности приводит к избыточному восстановлению компонентов фотосинтетической ЭТЦ, высокому значению градиента концентрации H^+ на мембране тилакоидов, избытку АТФ и НАДФН. В результате регуляции первичных механизмов фотосинтеза происходит тушение возбужденных состояний пигментов (развитие нефотохимического тушения) на уровне антенных комплексов за счет высокой энергизации фотосинтетических мембран, дезоксидации ксантофиллов и переноса части светособирающих белок-пигментных комплексов с ФС2 на ФС1. Эти светоиндуцированные обратимые структурные изменения тилакоидных мембран направлены на снижение скорости восстановления переносчиков акцепторной части ФС2 и ускорению потока электронов на уровне ФС1, что способствует снижению восстановленности промежуточных переносчиков и, соответственно, защищает клетку. Наши опыты с ингибиторами показывают, что снятие этих защитных механизмов приводит к резкому увеличению необратимых повреждений клеток на свету. В случае, когда интенсивность света соответствует возможностям системы регуляции первичных процессов фотосинтеза, время жизни восстановленных переносчиков становится небольшим и системы защиты успевают справиться с повреждениями. Если интенсивность света такова, что система регуляции не

способна оптимизировать поток электронов по ЭТЦ, а скорость генерации активных форм кислорода высока, инициируются процессы ПОЛ. В результате этих процессов нарушаются барьерные функции фотосинтетических мембран и происходит ускорение деструкции фотосинтетического аппарата. Для предохранения от этих повреждений клетка использует также разборку ключевого белка D1 реакционного центра ФС2, тем самым предотвращает восстановление ЭТЦ и, соответственно, генерацию активных форм кислорода в данном РЦ. Продолжительное облучение объекта светом высокой интенсивности приводит к полному блокированию фотосинтетической ЭТЦ в результате деструкции белков РЦ. Возможно, наибольшее значение в этих процессах имеет взаимодействие белков РЦ с окисленным первичным донором электронов $P680^+$. Описанные выше стадии окислительного повреждения степени деструкции фототрофных организмов можно определить по изменениям во времени показателей флуоресценции хлорофилла после перенесения водорослей в темновые условия (темновая репарация).

Наиболее перспективным для оценки экологического состояния водоема и определения функциональной активности фитопланктона представляется использование комплекса флуоресцентных методов. Такой комплекс позволяет определить следующие показатели: распределение количества фитопланктона в поверхностных водах по ходу судна при обследовании больших акваторий с помощью проточного флуориметра; регуляторные и адаптационные характеристики ФСА водорослей в пробах воды, извлеченной с определенных горизонтов, при помощи бортового флуориметра; обилие и эффективность работы ФСА фитопланктона по глубине «*in situ*» при помощи зонд-флуорометра.

Отработанный нами метод проточного флуориметра позволяет определить пространственную структуру фитопланктонного сообщества и оценить его функциональное состояние. Эта информация важна для выбора типичных или градиентных зон обследуемой акватории. Большой массив данных, получаемых по ходу судна, позволяет сопоставить их со спутниковыми картами распределения хлорофилла в море. Такое сопоставление может способствовать уточнению алгоритмов расчетов содержания хлорофилла по показателям спектральной яркости, получаемой со спутников.

В ряде случаев данные по проточной и зондовой флуориметрии вполне достаточны для анализа пространственно-временной изменчивости фитопланктонного сообщества и оценки его функционального состояния и построения соответствующих карт. Это происходит при медленно изменяющихся гидрофизических ситуациях, когда горизонты с максимумами содержания хлорофилла и переменной флуоресценции совпадают. В результате зондирования удастся оценить продукционные характеристики фитопланктона по глубине в исследуемом водоеме. Однако в быстроменяющихся условиях морской среды возможно несоответствие эффективности фотосинтеза величине биомассы водорослей. Это позволяет однозначно констатировать эти несоответствия и выявлять определенные фазы развития фитопланктонного сообщества. Например, в условиях подъема богатых биогенами масс воды из глубины на поверхность (апвеллинг) происходит быстрое заселение вод фитопланктоном. В начальный период такого процесса биомасса планктонных организмов невелика, тогда как эффективность световых реакций быстро возрастает до максимальных значений, характерным для молодых быстро растущих популяций. Подобная ситуация смоделирована нами при добавлении азотсодержащих веществ к культуре водорослей при дефиците азота (рис). Напротив, обнаружение большой биомассы фитопланктона, обладающего низкими значениями относительной переменной флуоресценции, указывает на процессы деградации фитопланктонного сообщества, что также хорошо иллюстрируется опытами с культурами водорослей при исчерпании биогенов. Особенно эти процессы усиливаются при интенсивной инсоляции, которые вызывают ингибирование активности РЦ ФС2.

Определение степени повреждения и обратимого фотоингибирования ФСА фитопланктона, происходящих в результате действия избыточных для водорослей интенсивностей света, возможно по изменению переменной флуоресценции в процессе адаптации в темноте. Низкие значения F_v/F_m у фотоингибированных водорослей могут существенно увеличиваться в темноте или на слабом свете. Значения относительной переменной флуоресценции, а также скорость ее увеличения при перенесении объекта в

темноту являются показателями глубины повреждения ФСА водорослей. Быстрое (за 1-2 часа) увеличение F_v/F_m до значений порядка 0,5 и более характерно для обратимого фотоингибирования, в поверхностных водах. Низкое (ниже 0,3) и неизменное при инкубировании в темноте значение относительной переменной флуоресценции соответствует глубоким необратимым процессам повреждения фитопланктона и является показателем деградации водного фитоценоза. Выяснение условий обитания, к которым адаптирован ФСА водорослей, возможно по значениям нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла под действием света определенной интенсивности. Таким образом, можно оценить, к каким световым условиям адаптированы водоросли. Эти данные могут представлять несомненный интерес для определения пространственно-временных адаптационных изменений состояния водного фитоценоза.

Таким образом, при применении подходов, рассмотренных в настоящей работе, удастся практически одновременно для одних и тех же пробах воды провести детальный анализ фитопланктонного сообщества и дать прогноз его развития. Высокая скорость измерения позволяет анализировать получаемую информацию непосредственно по ходу экспедиционных работ и вносить коррективы в планы исследования для более глубокого понимания функционирования водных экосистем. Представленные методики и флуорометрическая аппаратура при их комплексном использовании могут дать принципиально новую информацию о пространственно-временной изменчивости фитоценоза, а также служить составной частью системы экологического мониторинга состояния вод. Полученные результаты демонстрируют, что флуоресцентные методы могут быть эффективно использованы для характеристики реального состояния фитоценозов и прогнозирования его изменений в будущем.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены закономерности изменения состояния фотосинтетического аппарата *T. weissflogii* по флуоресцентным показателям хлорофилла (F_o , F_m , F_v/F_m и NPQ) при действии света высокой интенсивности (1100 Вт/м^2) и последующей инкубации в темноте. При фотоингибировании клеток, находящихся в оптимальных условиях уменьшение активности РЦ по F_v/F_m происходило за счет падения F_m . У культур, инкубируемых в условиях дефицита минерального питания изменение F_v/F_m сопровождалось резким уменьшением фоновой флуоресценции F_o .
2. С использованием ингибиторного анализа исследован вклад разных компонентов нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла на параметры флуоресценции при фотоингибировании. Показано, что при действии ингибитора дезоксидазы каротиноидов диадноксантинового цикла ДТТ, разобщителя FCCP, происходит снятие нефотохимического тушения, усиление процесса ФИ и появление необратимых фаз повреждения клеток при повышенных освещенностях. Ингибитор синтеза хлоропластных белков хлорамфеникол приводил к торможению репарации фотоингибированных клеток.
3. Азотное лимитирование культур морских водорослей ведет к накоплению неактивных РЦ ФС 2 и уменьшению F_v/F_m . Увеличение квантовой эффективности РЦ ФС 2 (по F_v/F_m) при добавлении минерального азота предшествовало началу увеличения количества клеток, что было описано для природного фитопланктона (период, предшествующий цветению водорослей). Увеличение в первые дни F_v/F_m происходило за счет снижения параметров флуоресценции F_o (F_o на клетку уменьшалось).
4. Показано, что подобные изменения параметров флуоресценции водорослей и восстановление фотосинтетической активности регистрируются и после внесения добавок мочевины и глицина. Это позволяет предположить возможность возникновения «цветения» летнего природного фитопланктона за счет ассимиляции азотсодержащих органических источников питания.
5. Обнаружено резкое усиление чувствительности ФС 2 культур микроводорослей к солям тяжелых металлов (сульфат меди, хлоридртути, метилртути) в условиях светового стресса, что связано с необратимым ингибированием ресинтеза D1-белка. Хлорид ртути и метилртути увеличивали тепловую диссипацию энергии возбуждения в антенных комплексах ФС 2, что, по предварительным данным, связано с нарушением процесса фосфорилирования в тилакоидах.
6. Обнаружено, что фитопланктон поверхностных горизонтов Черного и Балтийского моря после высокой солнечной инсоляции нуждается в репарации белков реакционных центров.

Степень фотоингибирования Fv/Fm и снижения Fo может существенно различаться для фитопланктона в различных условиях и местах обитания. Действие ингибитора синтеза хлоропластных белков хлорамфеникола вызывает торможение репарации активности морских водорослей, что указывает на роль биосинтетических процессов.

7. Разработан новый проточный флуориметр для оценки распределения и функционального состояния фотосинтеза фитопланктона в непрерывном режиме по ходу судна. Впервые изучены изменения характеристик быстрой флуоресценции хлорофилла на природном фитопланктоне с использованием проточного флуориметра. С учетом изменения параметров флуоресценции в поверхностных водах в условиях полуденной депрессии при солнечной инсоляции предлагается учитывать эти изменения. Предложено использовать проточный флуориметр в практических океанологических исследованиях состояния фитопланктона в акваториях Мирового океана.

8. Полученные в работе экспериментальные результаты вносят вклад в понимание процессов, приводящих к изменению фотосинтетической продуктивности природного фитопланктона и являются основой для использования метода быстрой флуоресценции в гидробиологических и океанологических исследованиях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Маторин Д.Н., Ильяш Л.В., Осипов В.А., Рубин А.Б. Биотесты как обобщенные показатели загрязнения среды в системе биомониторинга // Биотехнология в охране и реабилитации окружающей среды. Труды биотехнологического центра МГУ. – М. 2003 г. с. 137-141.
2. Маторин Д.Н., Осипов В.А. Биофизические методы биомониторинга // Фундаментальные и прикладные проблемы физики на Севере. Якутск, 2003 г.
3. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Осипов В.А., Рубин А.Б. Использование погружного флуориметра для оценки продуктивности фитопланктона и экологического состояния водоемов // Труды биотехнологического центра МГУ: «Биотехнология – охране окружающей среды» (часть II). Ред. Садчиков А.П., Котелевцев С.В. – М.: Изд-во «Спорт и культура», 2004. с. 102-105.
4. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Ильяш Л.В., Алексеев А.А. Использование люминесценции фототрофных организмов для оценки экологической безопасности водной среды // Труды биотехнологического центра МГУ: «Биотехнология – охране окружающей среды» (часть II). Ред. Садчиков А.П., Котелевцев С.В. – М.: Изд-во «Спорт и культура», 2004. с. 105-107.
5. Маторин Д.Н., Ильяш Л.В., Осипов В.А., Алексеев А.А. Биофизические методы биомониторинга // III Съезд биофизиков России. Тезисы докладов. Том II. Воронеж, 2004 г. с. 680-681.
6. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Осипов В.А., Казимирко Ю.В., Рубин А.Б. Использование двухлучевого импульсного погружного флуориметра для биомониторинга фотосинтетической активности фитопланктона // III Съезд биофизиков России. Тезисы докладов. Том II. Воронеж, 2004 г. с.682.
7. Запара, Е. В., Осипов В. А. Динамика флуоресцентных параметров диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* в зависимости от источника азота в условиях дефицита световой энергии // Международная научно-практическая конференция: «Человечество и окружающая природа». Сборник материалов. Москва, МГУ, 2004 г.
8. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Куликова Н.А., Алексеев А.А. Биотестирование водной среды с использованием люминесценции водорослей // Биотехнология, экология, охрана окружающей среды. Сборник научных трудов под ред. Садчикова А.П., Котелевцева С.В. – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2005. с. 71-75.
9. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Осипов В.А., Хаптер Р., Рубин А.Б. Использование флуоресценции хлорофилла для оценки продукционных характеристик фитопланктона // Биотехнология, экология, охрана окружающей среды. Сборник научных трудов под ред. Садчикова А.П., Котелевцева С.В. – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2005. с. 189-194.
10. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Осипов В.А., Возняк Б., Рубин А.Б. Методы флуоресцентного зондирования морского фитопланктона // Технические проблемы освоения мирового океана. Материалы международной научно-технической конференции. Владивосток, Изд-во «Дальнаука», 2005. с. 310-313.

11. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Осипов В.А., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла для мониторинга водоемов // Доклады МОИП. Том 36 (ред. А.П.Садчиков). – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2005. – с. 85-88.
12. Запара, Е. В., Осипов В. А. Динамика численности и флуоресцентных параметров *Pseudo-nitzschia delicatissima* в зависимости от источника азота в условиях дефицита световой энергии // 9-й съезд Всеросс. гидробиол.общества. Тольятти, 2006.
13. Маторин Д.Н., Братковская Л.Б., Осипов В.А., Алексеев А.А., Куликова Н.А., Ващанов Г.А. Использование флуоресценции хлорофилла водорослей для биотестирования загрязнений водной среды // Доклады МОИП. Том 39 (ред. А.П.Садчиков). – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2006. с. 116-119.
14. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Алексеев А.А. Малогабаритный флуориметр для определения состояния растений и водорослей // Доклады МОИП. Том 39 (ред. А.П.Садчиков). – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2006. с. 114-116.
15. Никифорова Н.А., Степанова М.В., Осипов В.А., Алексеев А.А. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла в фелодерме коры молодых побегов растений // Доклады МОИП. Том 39 (ред. А.П.Садчиков). – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2006. с. 129-131.
16. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Осипов В.А., Хаптер Р. Рубин А.Б. Исследование состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона Балтийского моря флуоресцентными методами // Вестн. моск. ун-та. Биология. № 1. 2006. с. 61-66.
17. Алексеев А.А., Осипов В.А., Маторин Д.Н. Метод определения состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла // Учебно-методическое пособие. Якутск, 2006. 65с.
18. Уланова А.Ю., Ильяш Л.В., Осипов В.А., Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Динамика флуоресцентных параметров морских планктонных водорослей *Tetraselmis viridis*, *Thalassiosira weissflogii* и *Pseudo-nitzschia delicatissima* при ассимиляции минеральных и органических форм азота // Доклады МОИП. (ред. А.П.Садчиков). – М.: Изд-во «Графикон-принт», 2006. (в печати)